

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Dr. H. Tiedemann

TRYPSINDISSOZIATION AN LEBER- GEWEBE VON HÜHNEREMBRYONEN

Optimale Bedingungen. Lebensfähigkeit der
gewonnenen Einzelzellen.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

medizinischen Fachbereichen der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Helmut Rogge

aus Berlin

1972

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Dr. H. Tiedemann

TRYPSINDISSOZIATION AN LEBER- GEWEBE VON HÜHNEREMBRYONEN

Optimale Bedingungen. Lebensfähigkeit der
gewonnenen Einzelzellen.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

medizinischen Fachbereichen der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Helmut Rogge

aus Berlin

Referent: Professor Dr. H.-J. Risse

Korreferent: Professor Dr. med. Elisabeth Köhler

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 19. Oktober 1972



Inhaltsverzeichnis

Seite

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	4
Einleitung	5
Material und Methoden	8
A. Dissoziationsmethoden	8
B. Stoffwechsel und Lebensfähigkeit	13
C. Stabilität von radioaktiver Markierung in den Zellen. Untersuchungen mit eingebautem Leucin und Thymidin	19
D. Aufarbeiten der Proben	21
III. Ergebnisse	24
A. Zur Dissoziationsmethode	24
B. Stoffwechsel und Lebensfähigkeit der Einzelzellen	29
C. Stabilität von DNA- und Protein-Markierung in den dissoziierten Zellen. Beziehung zur jeweiligen Leucin-Einbaurate	36
Diskussion	40
A. Dissoziation nach Trypsininkubation	40
B. Stoffwechsel und Lebensfähigkeit nach Dissoziation	42
C. Stabilität der untersuchten Markierungen	48
D. Verwendbarkeit der Zellen in Aggregationsversuchen	49
E. Elektronenmikroskopische Literatur	49
Zusammenfassung	50
Anhang	56
Zusammensetzung der einfachen Salzlösung R 5	56
Lebenslauf	57

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CMF	Calcium- und Magnesium-freies Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNP	2,4-Dinitrophenol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
E_g	Extinktion der gesamten, durch Trypsindissoziation hergestellten Suspension = Zellen + Erythrozyten + Trümmer
E_t	Extinktion der durch Zentrifugation abgetrennten Trümmerfraktion
ΔE	E_g minus E_t
E_z	Extinktion der durch Zentrifugation abgetrennten Zellfraktion
ipm	Impulse pro Minute
bis-MSB	p-Bis-(o-methylstyryl)-Benzol
n_z	Zahl der gezählten Zellen pro ml Suspension
PPO	2,5-Diphenyloxazol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
TCE	Trichloressigsäure
TPB	Tetraphenylboron

Einleitung

Einzelzellen, die durch mechanische oder chemische Dissoziation von Geweben gewonnen wurden, haben die Fähigkeit, innerhalb kurzer Zeit zu vielzelligen Verbänden zu reaggregieren. Der Grad der Reaggregation hängt von der Art der vorhergegangenen Dissoziation bzw. der Überlebensfähigkeit der Einzelzellen ab (39,41). Zur Untersuchung von Aggregationsvorgängen ist es notwendig, standardisierte Bedingungen für die Dissoziation zu schaffen. Im Folgenden soll berichtet werden über :

- A. die Ausarbeitung einer Dissoziationsmethode zur Herstellung von Einzelzellen aus embryonaler Hühnerleber,
- B. Untersuchungen über Stoffwechsel und Lebensfähigkeit der dissoziierten Zellen,
- C. Untersuchungen zur Stabilität radioaktiver Markierung in Protein und DNA der dissoziierten Zellen.

A. Dissoziationsmethode

1. In der von MOSCONA zur Dissoziation von embryonalen Geweben ausgearbeiteten Methode (36) wird Trypsin zur Erleichterung der Dissoziation benutzt. Es ist den häufig angewandten Chelatbildnern wie EDTA (4,5,10,30) überlegen (14,42). Andere Proteasen sind ebenfalls wirksam (5,14,32,49,58). In der vorliegenden Arbeit wird nur Trypsin verwandt. Da sich in der Literatur verschiedene Angaben über die anzuwendenden Trypsinkonzentrationen finden (3,14,21,36), und da embryonales Gewebe möglicherweise empfindlicher gegen Trypsin ist als adultes Gewebe, ist die Bestimmung des Konzentrationsoptimums von Trypsin zur Dissoziation erforderlich.

2. Ein enzymatisch inaktives Makromolekül wie Polyvinylpyrrolidon hat in Sucrose-Lösung ebenfalls dissoziationsfördernde

Wirkung (9). Dieser Befund könnte bedeuten, daß die Wirkung des Trypsins nicht allein eine Protease-Wirkung ist, sondern daß es analog PVP als inertes Makromolekül die Dissoziation fördert.

3. Die Zählung der Einzelzellen nach Dissoziation wurde in Zählkammern vorgenommen. Um den Beginn der Versuche an den trypsinisierten Zellen zu beschleunigen, wurde geprüft, ob die zeitraubende Zellzählung durch Extinktionsmessung im Photometer ersetzt werden kann.

B. Stoffwechsel und Lebensfähigkeit der gewonnenen Zellen

1. Als Indikator der Stoffwechselleistung wurde der Einbau von C-14-Leucin gemessen. Dies ist zulässig, da innerhalb des hier untersuchten kurzen Zeitraums nach Dissoziation mit Veränderung und Verlust von gewebsspezifischen Zelleistungen durch Mutation und Selektion nicht zu rechnen ist. Leucineinbaumessungen zur Beurteilung der Stoffwechselleistung sind üblich (10,19). Sie wurden zur Absicherung mit unterschiedlichen Methoden vorgenommen.

Dabei muß ausgeschlossen werden, daß die Zunahme von TCE-fällbarem Leucin auf einer Adsorption an die Zelloberfläche beruht. Eine Adsorption wäre durch Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung nicht zu beeinträchtigen. Dagegen würde die Proteinsynthese als ATP-abhängiger Prozeß gehemmt werden. Da nur der von intakten Zellen geleistete Leucineinbau gewertet werden soll, muß darüber hinaus festgestellt werden, ob ein zellfreies in-vitro-System bzw. Zelltrümmer, die bei der Dissoziation entstanden sind, zusätzlichen Leucineinbau bewirken. Nach Hemmung der oxydativen Phosphorylierung durch DNP kann ausgenutzt werden, daß ATP die intakte Zellwand offensichtlich nicht permeiert (50). ATP-Zusatz würde dann nur den Anteil der Proteinsynthese stimulieren, der durch defekte Zellen und Zelltrümmer, d. h. ein zellfreies in-vitro-System,

geleistet wird, nicht aber die intrazelluläre Proteinsynthese.

2. Die Lebensfähigkeit von Zellen in Suspension wurde bisher überwiegend durch Farbstoffexklusion geprüft (27,29). Dabei war es gleichgültig, ob es sich um genuine Einzelzellen oder um eben dissoziierte Zellen handelte. Es bleibt trotz der in der Literatur angegebenen guten Brauchbarkeit fraglich, wie weit die Farbstoffexklusion mit der Lebensfähigkeit korreliert, denn nach Dissoziation können Zellwandschäden auftreten, bei denen tight junctions mit anhängendem Zellplasma herausgerissen werden (5). Ein besseres Kriterium der Lebensfähigkeit ist die Vermehrung von kultivierten Zellen (33). Diese setzt DNA-Synthese und somit Thymidineinbau in TCE-fällbare Zellbestandteile voraus. Da Thymidineinbau ein eindeutigerer Parameter für intakte Zellfunktionen ist als die Farbstoffexklusion, wurde er hier als Kriterium der Lebensfähigkeit verwendet.

3. Die Biosynthese von RNA wurde am Einbau von Uridin untersucht und mit dem Leucin- und Thymidinstoffwechsel verglichen.

C. Stabilität von Protein- und DNA-Markierung in dissoziierten Zellen

Zur quantitativen Verfolgung von Aggregationsvorgängen lassen sich Zellen verwenden, die vor der Aggregation mit einem stabilen radioaktiven "marker" versetzt wurden. So markieren ROTH u. WESTON (51) Zellen mit Thymidin, lassen diese im Aggregationstest durch unmarkierte Aggregate sammeln und bestimmen die pro Aggregat gesammelten Zellen autoradiographisch. In unserem Labor ist die spätere Anwendung von markierten Zellen in Aggregationsversuchen beabsichtigt. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit das Verbleiben von markiertem Leucin und Thymidin in den Zellen überprüft.

II. Material und Methoden

A. Dissoziationsmethoden

Im Folgenden werden zwei Dissoziationsmethoden beschrieben : Die erste Methode soll möglichst viele Meßpunkte zur Ermittlung der optimalen Trypsinkonzentration liefern. Die gewonnenen Zellen werden nur zum Auszählen, nicht zur Aussaat in einem Kulturmedium verwendet. Deshalb ist steriles Arbeiten zweitrangig. Als Medium wurde die einfache Salzlösung "R 5" (siehe Anhang S. 56) benutzt. Die zweite Dissoziationsmethode soll als Standardmethode schnell, einfach und steril Zellen für radioaktive Einbauversuche bereitstellen. Als Medium wurde HAMS F 12 (24) verwendet.

1. Zur Bestimmung des Trypsinoptimums :

Das enzymatische Ablösen der Einzelzellen von Leberfragmenten (14) wird kombiniert mit dem zusätzlichen Einwirken möglichst standardisierter Energie (3). Als Enzym wurde eine Kombination von kristallisiertem Trypsin und DNase I + Mg^{++} angewendet (4,58). DNase wird zugesetzt, um DNA abzubauen, die während der Trypsineinwirkung aus geschädigten Kernen freigesetzt wird. Nach Inkubation wird das Enzymgemisch abzentrifugiert. Vor der folgenden mechanischen Dissoziation wurde Trypsininhibitor im Überschuß hinzugegeben, da gleichzeitiges Einwirken von Trypsin und mechanischer Belastung die Zellen schädigt (58), und da bekannt ist, daß Trypsin an dissoziierte Zellen adsorbiert wird (47). Die nicht dissoziierten Gewebereste wurden durch Absetzenlassen vom dissoziierten Überstand getrennt. Dieser wurde durch niedrigtourige Zentrifugation in Einzelzellen und restliche Gewebeteile fraktioniert. Die Zahl der gewonnenen Einzelzellen wurde durch Zählung bestimmt, zusätzlich wurden Extinktionsmes-

sungen an den durch Zentrifugation gewonnenen Fraktionen vorgenommen.

Material und Geräte

1. 8 bis 10 Tage bebrütete Hühnerembryonen,
2. einfaches Salzmedium R 5 (siehe Anhang S. 56) bzw. HAMS Medium F 12 (24),
3. Trypsin (3.4.4.4.) 209 U/mg (Worthington TRL),
4. Deoxyribonuclease I (3.1.4.5.) 2020 U/mg (Worthington D) + $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$,
5. Sojabohnen-Trypsininhibitor (Worthington SI).

Die Substanzen 3. bis 5. wurden in dem jeweiligen Medium gelöst.

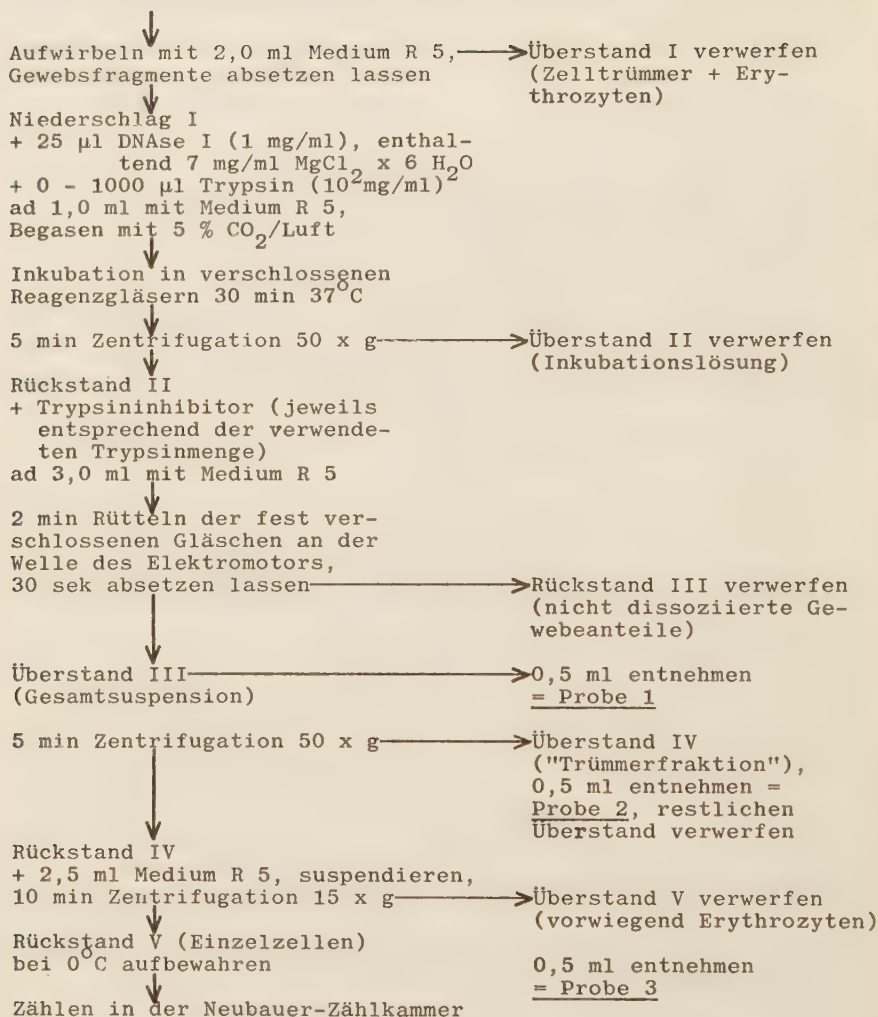
6. Neubauer-Zählkammer, 0,1 mm tief, $1/400 \text{ mm}^2$,
7. Phasenkontrastmikroskop, Spektralphotometer PMQ II, Monochromator M4Q III, Küvetten 1 ml MTL 4 Glas (Carl Zeiss, Oberkochen),
8. Reagenzgläser 80 x 9,5 bis 10 mm,
9. 5 ml-Einmalspritzen (Braun, Melsungen), 1,2 mm weite, gerade gesägte und entgratete Injektionskanülen,
10. Elektromotor mit exzentrisch rotierender Welle = "Rüttler".

Methode zur Bestimmung des Trypsinoptimums

Entnahme der Lebern aus den Embryonen, Aufbewahren in Medium R 5 bei 0°C → Gallenblasen abtrennen

↓
Lebern einzeln auf Objektträgern kleinschneiden, → anhaftendes Medium mit Filterpapier absaugen
Einwaagen pro Trypsinierungs-Ansatz 12 - 20 mg Feuchtgewicht





Die Proben 1 und 2 wurden mikroskopisch kontrolliert und 1 : 1 mit Medium verdünnt. Dann wurden die Proben 1 bis 3

im Photometer bei 620 nm gemessen, um ein einfaches Maß für die Menge der suspendierten Partikel zu gewinnen.

Probe 1 = Extinktion der Gesamtsuspension = E_g

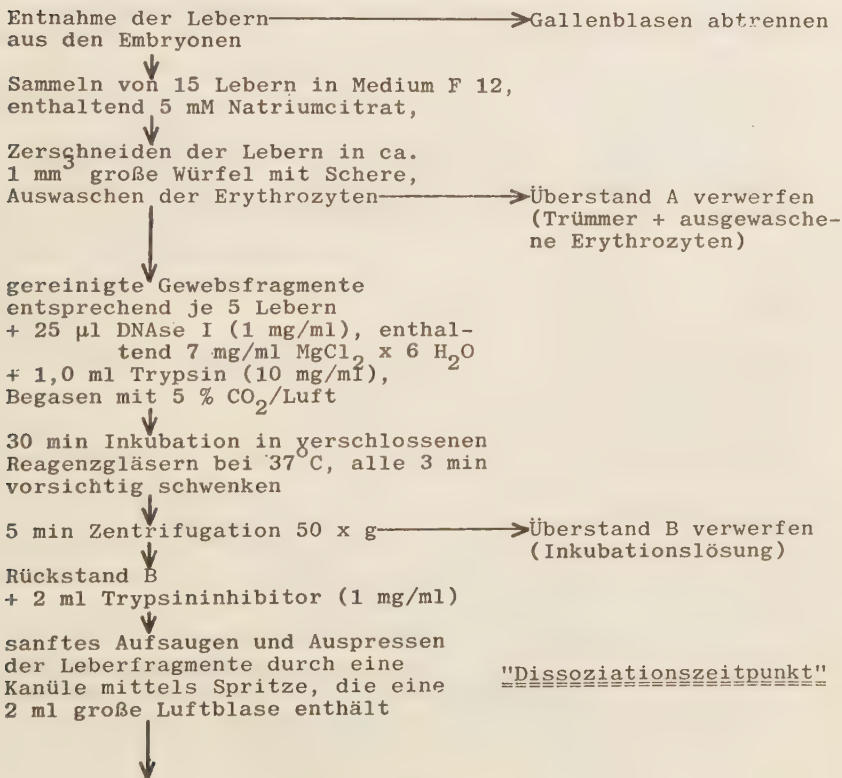
Probe 2 = Extinktion der Trümmerfraktion = E_t

Probe 3 = Extinktion der Zellfraktion = E_z

Die Versuche wurden als Dreifach-Bestimmungen durchgeführt.

2. Standardmethode zur Zellgewinnung :

Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.



↓
 30 min Inkubation in verschlossenen Reagenzgläsern bei 37°C
 ↓
 5 min Zentrifugation 50 x g → Überstand II' verwerfen (Inkubationslösung)
 ↓
 Rückstand II'
 + 2 ml Trypsininhibitor (1,5 mg/ml), zur Vermeidung von Viskositätsunterschieden für alle Ansätze gleich
 ↓
 Rütteln und weitere Aufarbeitung auf einzelne Zellen wie S. 10

B. Stoffwechsel und Lebensfähigkeit

Material

1. C-14-U-Leucin	312 mCi/mmol	16,0 ml/mCi	} (Radio-chemical Centre Amersham)
2. Uridin-5-H3	5 Ci/mmol	1 ml/mCi	
3. Thymidin(methyl-T)	14,1 Ci/mmol	1 ml/mCi	
4. 2,4-Dinitrophenol-Na-Salz		Mg 206,1	(DNP)
5. Adenosin-5'-triphosphat-Dinatriumsalz		Mg 605,2	(ATP)
6. Adenosin		Mg 267,2	
7. HAMS Medium F 12 (24)			

Lösungen

a. radioaktive Lösungen

50 µl der radioaktiven Stammlösung
 + 1000 µl sterilfiltriertes, begastes F 12
 = 1050 µl verdünnte Stammlösung

Weitere Benennung der verdünnten Stammlösungen :

C-14-Leucin = Lösung L
 H-3-Uridin = Lösung U
 (methyl-T)Thymidin = Lösung T

b. sonstige Lösungen

DNP-Lösung : 10,3 mg DNP in 10 ml F 12, pH 7,4.
(5 x 10⁻³ M)

ATP-Lösung : 303 mg ATP-Na₂ und 102 mg MgCl₂ x 6 H₂O
(5 x 10⁻² M) getrennt in je 5 ml F 12 lösen, mischen,
mit 5 % CO₂/Luft begasen, pH 7,4 mit
festem NaHCO₃ einstellen.

Adenosin-
Lösung : 67 mg Adenosin in 5 ml F 12 bei 55°C lösen,
(5 x 10⁻² M) abkühlen lassen, mit 5 % CO₂/Luft begasen,
pH 7,4 mit 1 n HCl einstellen.

Die Lösungen werden in den hier angegebenen Konzentrationen den Ansätzen hinzugefügt. Die Endkonzentrationen sind bei den einzelnen Ansätzen aufgeführt.

Zur Methodik der Einbauversuche

Die Zellsuspension, die durch die Standard-Dissoziationsmethode bereitgestellt worden war (siehe S. 11 f.), enthielt ca. $1,5 \times 10^6$ Zellen pro ml. Dieser Wert wurde photometrisch überprüft. Pro ml Zellsuspension werden 15 µl DNase I (1 mg/ml), enthaltend MgCl₂ x 6 H₂O (7 mg/ml), zugesetzt. 116 µl-Portionen werden auf Reagenzgläser verteilt und mit 5 % CO₂/Luft begast. Die verschlossenen Reagenzgläser werden im Wärmebad bei 37°C bis zur Zugabe der radioaktiven Lösungen inkubiert. Mit den Einbauversuchen wird möglichst bald nach der Dissoziation begonnen. Die Zeitangaben in den Einbauversuchen beziehen sich auf den "Dissoziationszeitpunkt" (siehe S. 11). Die Versuche wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

1. Leucineinbau zu verschiedenen Zeiten nach Dissoziation :
Es soll geprüft werden, ob die Einzelzellen nach der Dissoziation Leucin in einer konstanten Einbaurrate inkorporieren, und wie weit der Einbau vom Alter der Zellen (Zeitspanne nach Dissoziation) abhängt. Die erste Einbaukurve wird aufgenommen, sobald die Zellsuspension auf die Reagenzgläser verteilt ist. Zu bestimmten Zeitpunkten nach Dissoziation werden weitere Kurzzeit-Einbaukurven aufgenommen. Die Versuche werden jeweils als Dreifach-Bestimmungen durchgeführt.

Ansätze :

32 Reagenzgläser mit je 116 µl Zellsuspension, mit 5 % CO₂/Luft begasen, verschließen, bei 37°C im Wärmebad aufbewahren.

<u>Zeit nach Dissoziation</u>	<u>Zugabe von je 48 µl Lösung L (siehe S. 13) zu den Ansätzen Nr.</u>
1 h 20 min	1 - 8
2 h 40 min	9 - 16
4 h 45 min	17 - 24
20 h 30 min	25 - 32

Die Ansätze jeder Reihe werden nach 0, 2, 4, 8, 14, 30, 45 und 60 Minuten Inkubation mit C-14-Leucin (0,9 µCi/ml), wie auf Seite 21 beschrieben, abgestoppt und aufgearbeitet.

2. Messung des Leucineinbaus in Abhängigkeit vom Alter der Zellen (Einbauzeit jeweils 20 Minuten) :

Verteilen von je 116 µl Zellsuspension auf Reagenzgläser, mit 5 % CO₂/Luft begasen, verschließen, bei 37°C aufbewahren

↓
Einbaumessungen : Zugabe von je 48 µl Lösung L (ca. 0,9 µCi/ml C-14-Leucin-Endkonzentration) 1:00 h, 1:30 h, 2:50 h, 3:50 h, 4:50 h, 6:00 h und 7:15 h nach Dissoziation



↓
20 min Inkubation der verschlossenen Reagenz-
gläser bei 37°C. 1 Nullwert (0 min Inkubation)
pro Meßpunkt

↓
Abstoppen des Einbaus und sofortige weitere
Aufarbeitung, wie auf S. 21 beschrieben.

Die Messungen wurden als Dreifach-Bestimmungen durchgeführt.

3. Hemmung des Leucineinbaus durch DNP :

Vor Inkubation mit C-14-Leucin wird die oxydative Phosphorylierung mit DNP entkoppelt. Eine Hemmung des Leucineinbaus würde zeigen, daß eine energieabhängige Stoffwechselleistung vorliegt. Es werden Vierfach-Bestimmungen durchgeführt.

Verteilen der unmarkierten Zellsuspension
in 116 µl Portionen auf Reagenzgläser,
mit 5 % CO₂/Luft begasen, verschließen

DNP-gehemmter Ansatz

↓
Zugabe von 20 µl DNP-Lösung
(siehe S. 14), 15 min Inku-
bation bei 37°C (DNP-Konz.
 $7,4 \times 10^{-4}$ M)

↓
Zugabe von 20 µl Medium *
(siehe nächster Versuch)
+ 48 µl Lösung L

nicht gehemmte Kontrolle

↓
Zugabe von 20 µl Medium,
15 min Inkubation bei 37°C

↓
Zugabe von 20 µl Medium
+ 48 µl Lösung L, 1 Null-
wert (0 min Inkubation)

↓
45 min Inkubation bei 37°C (ca. 0,7 µCi/ml
C-14-Leucin Endkonzentration)

↓
Abstoppen und sofortige weitere Aufarbeitung,
wie auf S. 21 beschrieben.

4. Einfluß von ATP bzw. Adenosin auf den DNP-gehemmten Leucineinbau :

Durch ATP-Zusatz zum DNP-gehemmten Ansatz soll geprüft werden, ob extrazellulärer Leucineinbau stattfindet. Der Versuch wird entsprechend dem Schema auf Seite 16 unten durchgeführt. Nach der DNP-Vorinkubation wird als Abänderung anstelle der 20 µl Medium (siehe *) 20 µl ATP-Lösung (siehe S. 14) auf 5×10^{-3} M hinzugefügt, dann mit C-14-Leucin wie oben inkubiert.

Durch Adenosin-Zusatz zum DNP-gehemmten Ansatz soll geprüft werden, ob die durch ATP erzielte Wirkung auf der Abspaltung des Adenosins beruht. Der Versuch wird ebenfalls entsprechend dem Schema auf Seite 16 unten durchgeführt. Nach DNP-Vorinkubation wird anstelle der 20 µl Medium (siehe *) 20 µl Adenosin-Lösung (siehe S.14) auf 5×10^{-3} M hinzugefügt, dann mit C-14-Leucin wie oben inkubiert.

Diese Ansätze werden als Vierfachbestimmungen durchgeführt. Die Endkonzentration von C-14-Leucin beträgt ca. 0,7 µCi/ml.

5. Langzeitversuche zum Einbau von Leucin, Thymidin und Uridin :

Die Langzeitversuche sollen prüfen, wie lange die Zellen bei der Inkubation annähernd gleiche Stoffwechselbedingungen behalten, bzw. in wie weit der Einbau von Leucin, Uridin und Thymidin als Kriterium für die Intaktheit der dissoziierten Zellen verwertet werden kann.

a. Einbau von Leucin

Verteilen der Zellsuspension in 116 µl-Portionen auf Reagenzgläser, Zugabe von 48 µl Lösung L*(siehe S.13), mit 5 % CO₂/Luft begasen (C-14-Leucin-Endkonz. ca. 0,9 µCi/ml)



↓

Aufnehmen eines Nullwertes (0 min Inkubation)
und Beginn der Inkubation der verschlossenen
Reagenzgläser 1:15 h nach Dissoziation

↓

Abstoppen des Einbaus 1:45 h, 2:15 h, 4:15 h,
8:30 h und 20:30 h nach Dissoziation. sofortige
weitere Aufarbeitung, wie auf S. 21 beschrieben.

b. Einbau von Thymidin :

Der Einbau von Thymidin weist auf die Bereitschaft der Zellen zur Teilung und somit auf ihre Lebensfähigkeit hin. Der Langzeiteinbau wird entsprechend dem Schema auf Seite 17/18 untersucht. Anstelle der Lösung L werden 20 µl der Lösung T (Endaktivität 13 µCi/ml H-3-Thymidin) zugegeben. Die Inkubation wird 1:20 h nach Dissoziation begonnen, gleichzeitig wird ein Nullwert (0 min Inkubation) aufgenommen. Der Einbau wird abgestoppt 3:00 h, 3:30 h, 4:40 h, 6:40 h, 9:40 h und 11:40 h nach Dissoziation. Es werden Sechsfach-Bestimmungen durchgeführt.

c. Einbau von Uridin :

Der Einbau von Uridin wird im Vergleich zum Leucin- und Thymidineinbau entsprechend dem Schema auf Seite 17/18 gemessen. Zu der in 91 µl-Portionen verteilten Zellsuspension werden je 9 µl der Lösung U (Endaktivität 4,3 µCi/ml H-3-Uridin) gegeben. Die Inkubation wird 0:30 h nach Dissoziation begonnen, gleichzeitig wird ein Nullwert (0 min Inkubation) aufgenommen. Der Einbau wird abgestoppt 2:00 h, 2:30 h, 4:00 h, 5:00 h, 8:00 h, 9:00 h und 12:00 h nach Dissoziation. Es werden Dreifach-Bestimmungen durchgeführt.

C. Stabilität radioaktiver Markierung in den Zellen.
Untersuchungen mit eingebautem Leucin und Thymidin :

Die folgenden Versuche sollen das Verbleiben von radioaktiver Markierung in den dissoziierten Zellen prüfen. Zum Vergleich wird die jeweils vorhandene Stoffwechselaktivität durch einstündigen Leucineinbau bestimmt. Material und Lösungen siehe Seite 13 und 14. Die Versuche werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

1. Verbleiben von Leucin :

Im zu untersuchenden Zeitraum ist noch mit Leucineinbau zu rechnen. Deshalb müssen die Zellen nach radioaktiver Markierung gewaschen und in einem nicht markierten Medium weiter inkubiert werden. Die Meßreihe beginnt nach Markieren und Waschen 6:20 h nach Dissoziation.

Markieren der Zellen :

6 ml Zellsuspension in 25 ml-Erlenmeyer + 3 ml Lösung L (0,7 μ Ci/ml C-14-Leucin-Endaktivität) mit 5 % CO₂/Luft begasen, Gefäße verschließen, 120 min Inkubation bei 37°C



5 min Zentrifugation 100 x g, 2 x Waschen mit nicht markiertem Medium, enthaltend 10⁻⁴ M C-12-Leucin



gewaschene Zellen in nicht markiertem Medium suspendieren (Zellkonz. 0,5 x 10⁶ Zellen/ml), in 151 μ l-Portionen auf Reagenzgläser verteilen, mit 5 % CO₂/Luft begasen, verschließen



Meßreihe :

6:20 h nach Dissoziation Bestimmung eines Ausgangswertes und Beginn der Inkubation im Wärmebad bei 37°C. Weitere Meßpunkte 9:20 h, 11:20 h, 13:20 h, 18:20 h, 25:50 h, 45:20 h und 66:20 h nach Dissoziation.

je 2 Proben



je 2 Proben

Messung der verbliebenen
Stoffwechselaktivität :

↓
Zugabe von 48 µl Lösung L
60 min Inkubation bei 37°C

↓
Abstoppen und weitere Auf-
arbeitung siehe S. 21
(Leucineinbau als Doppel-
bestimmung)

Messung der verbliebenen
Markierung :

↓
Zugabe von 48 µl Medium
60 min Inkubation bei 37°C

↓
Abstoppen und weitere Auf-
arbeitung siehe S. 21
(Leucinverbleib als Doppel-
bestimmung)

2. Verbleiben von Thymidin :

Im Gegensatz zum vorherigen Versuch wird auf den Waschgang verzichtet, da die Zellen den Einbau von Thymidin laut Abb. 8 ca. 7 Stunden nach Dissoziation einstellen. Das Medium enthält, wie auch bei den anderen Einbauversuchen, 15 µg/ml DNase I. Die Meßserie beginnt 6:40 h nach Dissoziation.

Markieren der Zellen :

Verteilen der Zellsuspension in 116 µl-
Portionen auf Reagenzgläser, Zugabe von
je 48 µl Lösung T 1:20 h nach Dissozia-
tion, 5:20 h Inkubation bei 37°C

Meßreihe :

↓
Beginn bei Abschluß des Thymidineinbaus
ca. 7 h nach Dissoziation. Meßpunkte bei
6:40 h, 8:40 h, 10:40 h, 26:10 h, 44:40 h
und 64:40 h nach Dissoziation

je 3 Proben

Messung der verbliebenen
Stoffwechselaktivität :

↓
Zugabe von 48 µl Lösung L
60 min Inkubation bei 37°C

↓
Abstoppen und weitere Auf-
arbeitung siehe S. 21

↓
(Leucineinbau als Dreifach-
bestimmung)

Messung der verbliebenen
Markierung :

↓
Zugabe von 48 µl Medium
60 min Inkubation bei 37°C

↓
Abstoppen und weitere Auf-
arbeitung siehe S. 21

↓
(Thymidinverbleib nach
Korrektur als Sechsfach-
bestimmung)

D. Aufarbeiten der Proben

Material :

1. Rundfilter 2,2 cm Ø (Carl Schleicher u. Schüll),
2. Konstriktionspipetten (H.E. Pedersen, Dänemark),
3. 350-Watt-Föhn,
4. TCE p.A.,
5. Beckman-Scintillationszähler DPM-100
6. zugehörige Glasküvetten,
7. Scintillationsflüssigkeit Toluol p.A.,
enthaltend 4 gr/l 98% PPO + 2 % bisMSB (Omnifluor/
NEN-Chemicals)

1. Abstoppen des Einbaus :

Folgende Methoden zum Abstoppen der Versuche wurden erprobt und miteinander verglichen :

- a. Aufkochen der Proben für 30 Sekunden,
- b. Zugabe von TCE auf 5 % w/v,
- c. Einfrieren in flüssigem N₂,
- d. Auftragen der Probe auf Rundfilter sofort nach Entnahme, anschließend Trocknen im heißen Luftstrom (55, vergl. auch 7, 8, 34).

Bei a. bis c. wurden die Proben anschließend, oder nach dem Aufbewahren bei minus 20°C sofort nach dem Auftauen, auf Rundfilter aufgetragen. Diese wurden, wie unten beschrieben, im heißen Luftstrom getrocknet. Bei Methode a. und b. verklumpten die Zellen. Dadurch ließen sich die Proben schlecht mit Konstriktionspipetten pipettieren. Das verklumpte Material wurde ungleichmäßig auf dem Rundfilter verteilt. Bei Mehrfachbestimmungen streuten die Werte erheblich.

Methode c. beendete wie a. und b. den Einbau sofort. Wenn viele Proben aufzuarbeiten waren, tauten die Proben unterschiedlich schnell auf. Die Folge war ebenfalls schlechte Reproduzierbarkeit.

Methode d. ergab mit einer Streuung von $s < 3\%$ die beste Reproduzierbarkeit- Der "Nullwert", der durch Auftragen der Zellsuspension sofort nach Zusatz der Radioaktivität gewonnen wird, ist eigentlich ein 2- bis 3-Minuten-Einbauwert. Denn vom Auftragen des ersten Tropfens der noch lebenden Zellsuspension auf den Rundfilter bis zur völligen Trockenheit werden ca. 3 Minuten benötigt. Der dabei entstandene Fehler ist bei den Ergebnissen B.1 und B.2 zu berücksichtigen.

Methode d. wird als Standardmethode zum Abstoppen der Versuche angewandt. Im einzelnen :

Ein Föhn wird in ca. 15 cm Höhe über einer Glasplatte angebracht. Etwa 5 Minuten vor Benutzung wird eingeschaltet, um ein gleich schnelles Eintrocknen bei 65°C zu erzielen. Die mit Bleistift bezifferten Rundfilter werden durch zwei möglichst peripher angebrachte, spitze Pinzetten über der Glasplatte festgeklemmt. Die radioaktive Zellsuspension wird mit einer Konstriktionspipette von 60 bis 70 μl aufgetragen. Dieses Volumen wird vom trockenen Rundfilter bei gleichmäßiger Verteilung mit einem Mal aufgesaugt. Das restliche Volumen der Suspension wird allmählich auf den geföhnten Filter aufgetragen. Das leere Reagenzglas wird mit einem Pipettenvolumen Medium durch zweimaliges Aufsaugen und Spülen ausgewaschen, die Spülflüssigkeit ebenfalls auf den Filter gebracht. Das Auftragen von ca. 170 μl Suspension plus ca. 60 μl Spülflüssigkeit dauert ca. 80 Sekunden. Weitere 120 Sekunden werden die Rundfilter trockengeföhnt. 40 Sekunden stehen dann bei Entnahme im 4-Minuten-Intervall zum Wechsel des Rundfilters und zum Bereitstellen der nächsten Probe zur Verfügung.- Zur Vermeidung von methodisch bedingten Streuungen ist weiterhin zu beachten: a. beim Auftragen dürfen die Pinzettenspitzen

nicht benetzt werden. Im kapillären Spalt zwischen den Branchen wird die Zellsuspension vom Filter weggesaugt. Der zu bestimmende Wert wird zu gering und das Arbeitsgerät wird radioaktiv kontaminiert. b. Auf den schon feuchten Filter darf nicht im Schwall aufgetragen werden. Der Luftstrom des Föhns reißt sonst Tropfen vom Filter auf die zum Auffangen untergelegte Glasplatte. c. Konstriktion und Öffnung der Pipette dürfen nicht zuviel Widerstand bieten, da sonst nicht allmählich aufgetragen werden kann. Die unter 'Material' angegebene Art Konstriktionspipette erfüllt diese Bedingung.

2. Aufarbeiten und Zählen der Proben :

Die Rundfilter werden sofort nach Abschluß einer Meßserie, wie von SÜSS u. VOLM (55) beschrieben, aufgearbeitet. Liegenlassen über Stunden in geheizten Räumen scheint eine erhöhte Adsorption des radioaktiven Materials an die Rundfilter zu verursachen. Zu 10 Rundfiltern pro 100 ml Waschflüssigkeit wird ein elfter zur Kontrolle der Waschvorgänge mit aufgearbeitet, der als "Waschwert" 40 bis 50 ipm enthält. Die Küvetten werden mit 5 ml Scintillationsflüssigkeit gefüllt. Die Rundfilter liegen plan auf dem Boden der Küvetten. Die Proben werden je 20 Minuten oder auf 3 % statistischen Fehler gezählt. Der Mittelwert der drei Zählungen geht in die weitere Rechnung ein.

III. Ergebnisse

A. Zur Dissoziationsmethode

1. Konzentrationsoptimum für Trypsin :

Lebergewebe aus 9 Tage alten Hühnerembryonen wurde in Trypsinlösung inkubiert und anschließend dissoziiert. Die Konzentration des Trypsins wurde von 1 bis 10 mg/ml variiert. Unterhalb 1 mg Trypsin pro ml Inkubationslösung war die Dissoziation unvollständig. Am Boden der Reagenzgläser setzten sich mit dem Auge erkennbare Gewebsfragmente ab. Dementsprechend zeigt die Extinktion der Gesamtsuspension E_g (Abb. 1) eine starke Zunahme bis 1 mg/ml Trypsin. Die Extinktion der Trümmerfraktion E_t verhält sich bis zur Konzentration von 1 mg/ml Trypsin ähnlich wie E_g . Je mehr Gewebe dissoziiert wird, desto mehr Trümmer entstehen. Oberhalb 1 mg/ml sinkt die Trümmermenge pro eingesetztem Gewebe, obwohl E_g noch zunimmt. ΔE , die Differenz zwischen E_g und E_t , entspricht den intakten Zellen bei etwa konstanter Beimengung von Erythrozyten. Der Anstieg zwischen 1 und 10 mg/ml weist auf die Zunahme der gewonnenen Einzelzellen hin.

Ein besserer Parameter hierfür ist jedoch die Extinktion der Zellfraktion E_z (Abb. 2). Sie zeigt eine deutliche Zunahme der Zellausbeute pro eingesetztem Gewebe bei steigenden Trypsinkonzentrationen. Die größte Ausbeute findet sich bei 10 mg Trypsin pro ml Inkubationsmedium. Höhere Konzentrationen wurden wegen der erheblichen Viskosität solcher Lösungen nicht untersucht.

Die Zellkonzentration wurde parallel zur Extinktionmessung durch Zählung mit der 0,1 mm tiefen Neubauer-Zählkammer bestimmt. n_z ist die Zahl der intakten Einzelzellen pro ml Zellfraktion; bis zu 5-Zell-Aggragaten wurden bei der Zählung die Zellen noch mit berücksichtigt. Die Zellzählung führte zum gleichen Ergebnis wie die photometrische Messung der Zellfraktion.

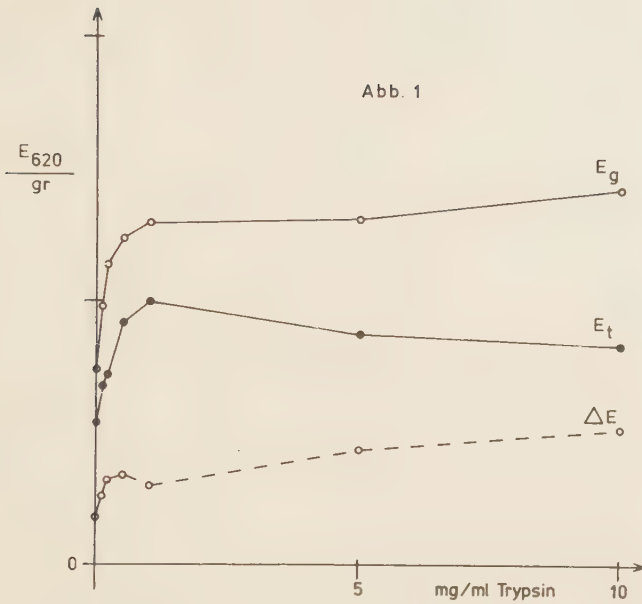


Abb. 1 : Abhängigkeit der Dissoziation von der Trypsin-
konzentration :

Ordinate : Extinktion der einzelnen Fraktionen bei
620 nm pro Gramm Frischgewicht Lebergewebe
(Fraktionen jeweils 1 : 1 verdünnt)

E_g = Extinktion der durch Dissoziation gewonnenen
Gesamtsuspension;

E_t = Extinktion der durch Zentrifugation abgetrenn-
ten Trümmerfraktion,

$\Delta E = E_g - E_t$, entspricht ungefähr der Zellfraktion.

Die Punkte sind Mittelwerte von Dreifach-Bestimmungen.

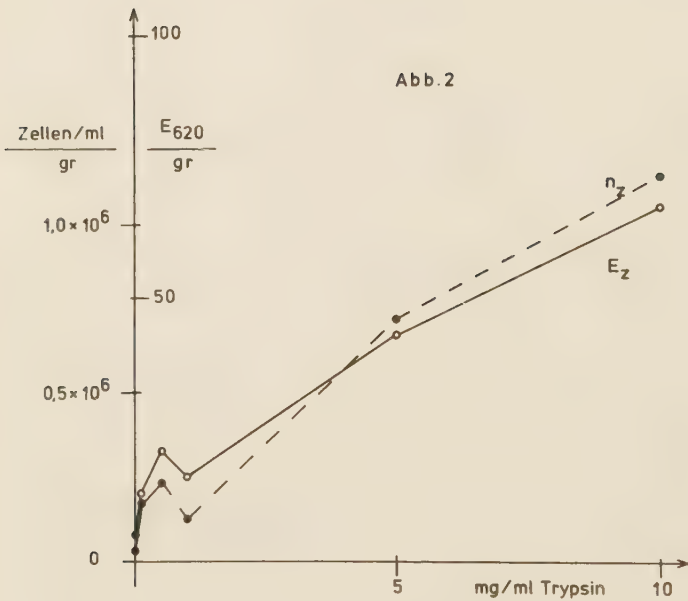


Abb. 2 : Abhängigkeit der Ausbeute an Einzelzellen von
der Trypsinkonzentration :

Ordinate : Ausbeute an Einzelzellen pro Gramm
Feuchtgewicht des eingesetzten Lebergewebes :
 n_z = Zellkonzentration der Zellfraktion in
Zellen pro ml,
 E_z = Extinktion der Zellfraktion bei 620 nm.

Die Punkte sind Mittelwerte von Dreifach-Bestimmungen.

2. Bestimmung der Zellzahl durch Extinktionsmessung :

Es wurde untersucht, in welchem Extinktionsbereich die Zellzählungen mit der Zählkammer durch Extinktionsmessungen ersetzbar sind.

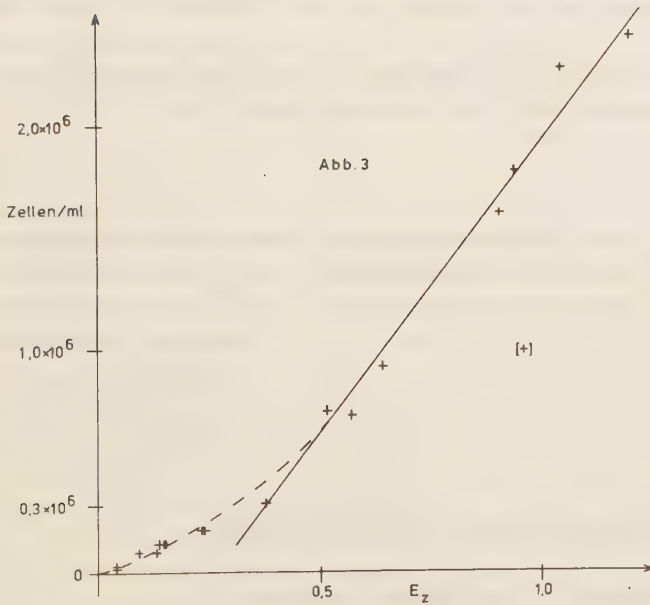


Abb. 3 : Vergleich der Extinktionsmessung mit der Zellzählung :

n_z = Zellkonzentration der Zellfraktion (Zellen/ml),
bestimmt durch zweimalige Zählung in der Zählkammer,
 E_z = Extinktion der Zellfraktion bei 620 nm.

Im Extinktionsbereich $E = 0,375$ bis $1,20$ besteht eine nahezu lineare Beziehung zwischen n_z und E_z . Für diesen Bereich kann aus E_z die Zellzahl errechnet werden :

$$n_z = (2,5 \times E_z - 0,625) \times 10^6 \quad \text{Zellen/ml}$$

Die Korrelation zwischen E_z und n_z war unabhängig von der zur Inkubation benutzten Trypsinkonzentration.

3. Zum Mechanismus der dissoziationsfördernden Wirkung des Trypsins :

Im folgenden Versuch wurde geprüft, ob Trypsin auch als inaktives Makromolekül eine dissoziationsfördernde Wirkung analog PVP hat.

Ansatz	im Inkubationsmedium		gewonnene Einzelzellen (n_z pro mg Leber)
	Trypsin	Tr-Inhibitor	
A	+	Ø	91.000 $\pm$ 23.500
B	+	+	2.700 $\pm$ 2.200
Kontrolle	Ø	Ø	5.600 $\pm$ 300

Tab. 1 : Dissoziationswirkung des Trypsins :

Ansatz A : als aktive Protease,

Ansatz B : als inaktives Makromolekül,

Kontrolle: Dissoziation ohne proteolytische
Vorinkubation.

Die Ergebnisse sind Mittelwerte von Vierfach-Bestimmungen.

Im Ansatz B, der mit dem proteolytisch nicht wirksamen Trypsin-Inhibitor-Komplex vorinkubiert worden war, war die Zellausbeute genauso schlecht wie bei der ausschließlich mechanisch dissoziierten Kontrolle (Tab. 1). Nach Trypsin-Vorinkubation war die Zellausbeute, bezogen auf die eingesetzte Gewebsmenge, etwa 20 bis 30 mal so hoch.

In Vorversuchen wurde eine geringfügige Verbesserung des Dissoziationsergebnisses durch PVP-Vorinkubation gefunden. Bei gleichzeitiger Anwendung des erheblich wirksameren Trypsins ist der PVP-Effekt nicht mehr nachweisbar.

B. Stoffwechsel und Lebensfähigkeit der Einzelzellen

1. Kurzzeitiger Leucineinbau zu verschiedenen Zeiten nach Dissoziation :

Die Zellen wurden nach Dissoziation in unmarkiertem Medium aufbewahrt. Zu bestimmten Zeiten nach dem Dissoziationszeitpunkt (siehe S. 11) wurden Leucin-Einbaukurven über je 60 Minuten aufgenommen. Abb. 4 zeigt, in welcher Weise der Leucineinbau durch die Aufbewahrung der Zellen beeinträchtigt wird. Bei Inkubationszeiten unter 20 Minuten zeigen sich geringe Schwankungen. Während Inkubationszeiten von 20 bis 60 Minuten verlaufen alle Kurven linear. Das bedeutet, daß man Einbauwerte miteinander vergleichen kann, die innerhalb dieses Zeitraumes gemessen wurden, auch dann, wenn die Einbauversuche zu unterschiedlichen Zeiten nach Dissoziation begonnen wurden. Bewahrt man die Proben allerdings länger als ca. 5 Stunden auf, so sinkt der Leucineinbau hier auf Werte, die nicht mehr zu gebrauchen sind. Abb. 5 gibt noch einmal wieder, wie die Größe des Leucineinbaus vom Alter der Zellen nach Dissoziation abhängt. In diesem Versuch wurden sämtliche Proben 20 Minuten inkubiert. Wie aus weiteren Versuchen hervorging (Abb. 9), ist 30 bis 45 Stunden nach Dissoziation kein Einbau mehr nachweisbar.

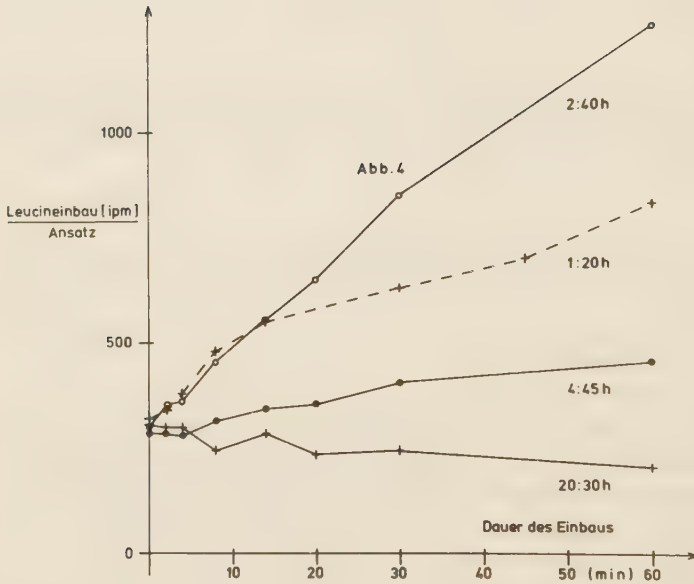


Abb. 4 : Einstündige Einbaukurven für Leucin zu verschiedenen Zeiten nach Dissoziation :

Die Stundenangaben an den Kurven geben den Zeitpunkt nach Dissoziation an, zu dem das C-14-Leucin zur unmarkierten Zellsuspension gegeben wurde. Dieser Zeitpunkt entspricht jeweils dem Beginn der Einbaukurve. Die Punkte sind Mittelwerte von Dreifach-Bestimmungen. (Ansätze siehe S. 15)

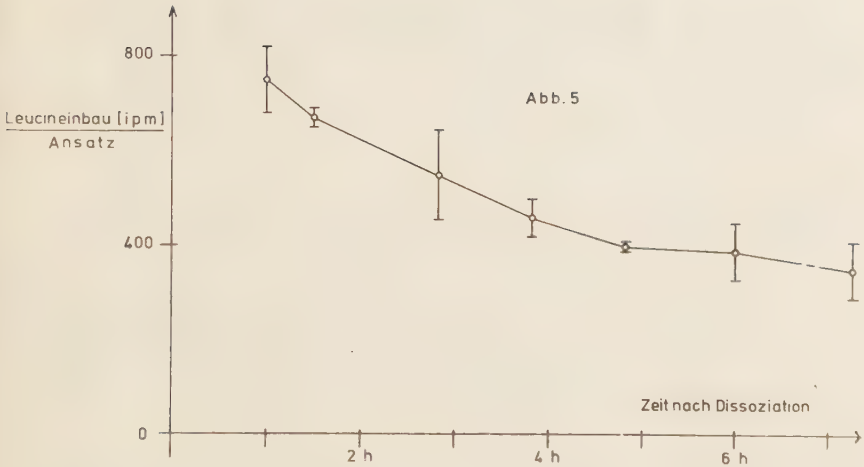


Abb. 5 : Verlauf des Leucineinbaus nach Dissoziation :

Abszisse : Aufbewahrungsdauer der dissoziierten Zellen im unmarkierten Medium,

Ordinate : Leucineinbau (ipm) pro Ansatz nach 20 Minuten.

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die 20-Minuten-Inkubation mit C-14-Leucin begonnen. Die Punkte sind Mittelwerte von Dreifach-Bestimmungen mit Streuung. Sie sind um den durchschnittlichen Nullwert berichtigt. (Ansätze siehe S. 15/16)

2. Einfluß von DNP auf den Leucineinbau :

Ansatz	dem Inkubationsmedium zugefügt			Einbauwerte (ipm) -Embryonalalter-	
	DNP	ATP	Adenosin	8 Tage	12 Tage
Kontrolle	Ø	Ø	Ø	1.480	580
a	+	Ø	Ø	505	425
b	+	+	Ø	280	340
c	+	Ø	+	*	230
Nullwert	--	--	--	280	280

Tab. 2 : Einfluß von DNP, ATP und Adenosin auf den Leucineinbau :

Erläuterungen siehe im Text. Die angegebenen Werte sind aus Vierfach-Bestimmungen gemittelt. * = dieser Wert wurde nicht bestimmt. (Ansätze siehe S. 16/17)

a. 15 Minuten vor der Inkubation mit C-14-Leucin wurde DNP auf $7,4 \times 10^{-4}$ M zur Zellsuspension hinzugegeben, um die oxydative Phosphorylierung zu hemmen. Der Leucineinbau sank dadurch auf 18 bis 31 % der nicht gehemmten Kontrolle.

b. Nach DNP-Vorinkubation ($7,4 \times 10^{-4}$ M) für 15 Minuten wurde ATP-Lösung auf $5,5 \times 10^{-3}$ M zur Zellsuspension hinzugefügt. Die Inkubation mit C-14-Leucin wurde unmittelbar angeschlossen. Der DNP-gehemmte Einbau wurde durch ATP nicht stimuliert. Die Leucininkorporation sank auf 0 bis 11 % der nicht gehemmten Kontrolle.

c. Aus dem ATP wird in der Zellsuspension möglicherweise Adenosin freigesetzt. Wird der Zellsuspension anstelle des ATP Adenosin auf 5×10^{-3} M zugefügt, so sinkt der Leucineinbau auf 75 % des Nullwertes. Der Nullwert enthält jedoch einen etwa zweiminütigen Einbau während des

Auftragens auf den Rundfilter (vergl. Methoden S. 22).
d. Bei Zellen aus älteren Embryonen ist der ungehemmte Leucineinbau wesentlich geringer.

3. Langzeiteinbau von Leucin, Uridin und Thymidin :

Die Zellsuspension wurde nach Dissoziation jeweils mit a. C-14-Leucin, b. H-3-Uridin, c. H-3-Thymidin versetzt. Die Ansätze blieben bis zum Abstoppen der einzelnen Proben im Wärmebad bei 37° C.

a. Leucin wird unter diesen Bedingungen bis zum Meßpunkt 8:30 h nach Dissoziation mit konstanter Geschwindigkeit eingebaut (Abb. 6). Später nimmt die TCE-fällbare Radioaktivität langsamer, aber noch deutlich, zu.

b. Der Einbau von Uridin ist bis ca. 6 Stunden nach Dissoziation gleichbleibend (Abb. 7). Später nimmt die TCE-fällbare Radioaktivität kaum noch zu.

c. Thymidin wird bis ca. 7 Stunden nach Dissoziation mit konstanter Rate eingebaut (Abb. 8). Dann endet der Einbau abrupt. Obwohl das Medium weiterhin H-3-Thymidin enthält, nimmt die TCE-fällbare Radioaktivität ab. Das Inkubationsmedium enthält 15 µg/ml DNase I und 10^{-3} M Mg^{++} .

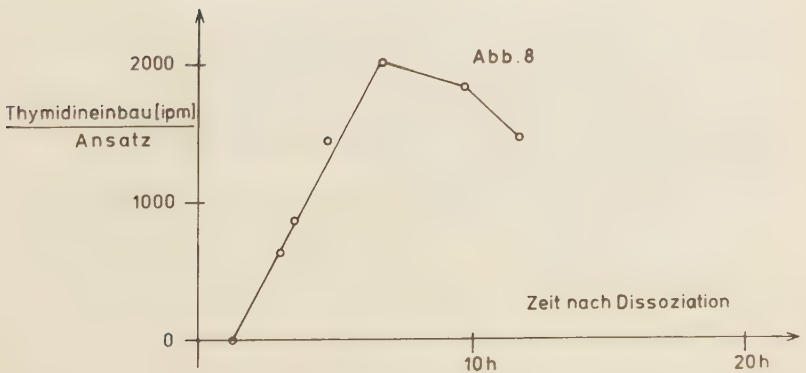
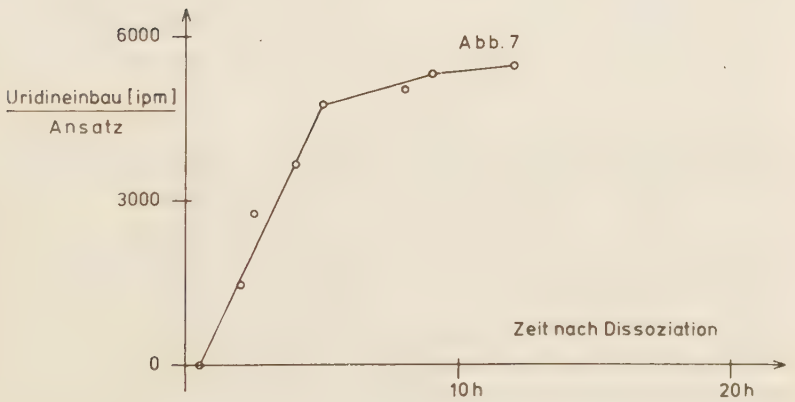
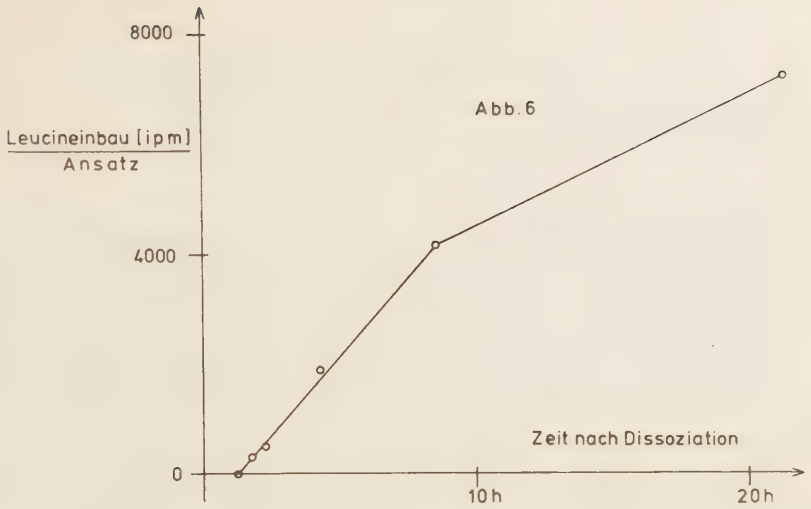
Legende zu

Abb. 6 bis 8 : Langzeiteinbau in dissoziierte Zellen.

Vergleich von Leucin, Uridin und Thymidin :

Ordinate : Einbau (ipm) der im Medium enthaltenen radioaktiven Substanz bei fortgesetzten Inkubation.

Die Schnittpunkte der Kurven mit den Abszissen geben jeweils den Beginn der radioaktiven Inkubation an. Die Punkte sind Mittelwerte, bei Uridin und Leucin von Dreifach-Bestimmungen, bei Thymidin von Sechsfach-Bestimmungen. Die Werte sind um die Nullwerte korrigiert. Das Medium enthält DNase I. (Ansätze siehe S. 17/18)



C. Stabilität von DNA- und Protein-Markierung in dissoziierten Zellen. Beziehung zur jeweiligen Leucin-Einbaurate

1. C-14-Leucineinbau :

In den folgenden Versuchen zur Stabilität von DNA- und Protein-Markierung wurde gleichzeitig der jeweilige C-14-Leucineinbau durch einstündige Inkubation als Kriterium der vorhandenen Stoffwechselleistung gemessen. Die in Abb. 9 dargestellte Kurve entstammt dem Thymidinansatz. Sie beginnt nach Abschluß der DNA-Markierung 6:40 h nach Dissoziation.

In dem DNA-Markierungsansatz sinkt der Leucineinbau zwischen 7 und ca. 10 Stunden nach Dissoziation rasch, später langsamer. 30 bis 40 Stunden nach Dissoziation war kein weiterer Leucineinbau mehr nachzuweisen.

2. Stabilität der DNA-Markierung :

Die Zellen wurden nach Dissoziation für 5:20 h mit H-3-Thymidin inkubiert, um die DNA zu markieren. Da laut Abb. 8 der Thymidineinbau 7 Stunden nach Dissoziation spontan endet, wurde das Verhalten der DNA-Markierung von diesem Zeitpunkt an gemessen, ohne das radioaktive Thymidin auszuwaschen. Abb. 10 zeigt, daß in den ersten 24 Stunden 60 % der eingebauten Markierung verlorengehen. Von der verbliebenen Markierung werden in den nächsten 24 Stunden erneut 50 % abgebaut. Der Kurvenverlauf der DNA-Markierung (Abb. 10) zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die im gleichen Ansatz gemessene Stoffwechselaktivität (Abb. 9), die durch C-14-Leucineinbau über je eine Stunde bestimmt wurde.

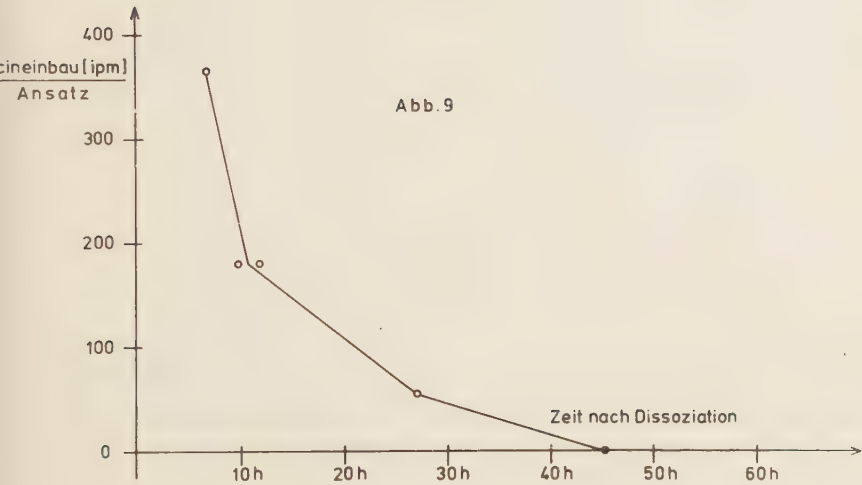


Abb. 9 : Stoffwechselaktivität im DNA-Markierungsansatz :

Ordinate : jeweiliger C-14-Leucineinbau, durch 60-minütige Inkubation gemessen.

Die Punkte sind Mittelwerte aus Dreifach-Bestimmungen. Sie sind um die Nullwerte korrigiert.
(Ansätze siehe S. 19 bis 20)

IV. Diskussion

A. Dissoziation nach Trypsininkubation

1. Methodik :

Die angewandte Dissoziationsmethode lehnt sich an die von MOSCONA (36) beschriebene an. Es werden folgende Abänderungen vorgenommen :

a. Auf die CMF-Vorinkubation wird verzichtet. i. Während der Einfluß von zweiwertigen Kationen auf den Zusammenhalt von Schwämmen (28,38) und embryonalen Stadien von Amphibien (22, 26) bekannt ist, wird er bei höheren Organismen angezweifelt (14). Bei Ca^{++} -Zusatz zur Trypsinlösung wird sogar eine bessere Dissoziation beschrieben (4). Es ist ohnehin nicht sinnvoll, die zweiwertigen Kationen vor der Trypsininkubation zu entfernen. Bei dieser ist nämlich Mg^{++} in einer Konzentration von 10^{-3} M neben DNase I erforderlich, um das Auftreten von DNA-Schleim zu verhindern. ii. Durch Verzicht auf die CMF-Vorinkubation kann zu einem früheren Zeitpunkt nach Entnahme der Organe aus dem Embryonen mit den Einbauversuchen begonnen werden.

b. Die Lebern werden sofort nach der Entnahme in Medium zerschnitten, das mit Natriumcitrat versetzt ist. Die angewandte Konzentration von 5 mM reicht zur Hemmung der Blutgerinnung durch Ca^{++} -Entzug aus. Neben der erwähnten CMF-Inkubation wird der Ca^{++} -Entzug von einigen Autoren durch TPB- (10) und EDTA- (1,4,30) Einwirkung vorgenommen, um den interzellulären Zusammenhalt zu beeinflussen. Der Zusatz von Citrat hat die Wirkung, i. die Erythrozyten weitgehend auszuschwemmen, ii. das Verkleben der Zellen durch geronnenes Blut zu verhindern, iii. durch Freispülen der Kapillaren dem begasten Medium den Zutritt zu den im Fragmentinneren gelegenen Zellen zu ermöglichen und somit Schäden durch Anoxie zu verhindern.

c. Nach WIEPJES u. PROP (58) sind Zellen in Gewebsfragmenten während Enzymeinwirkung äußerst empfindlich gegenüber mechanischer Belastung. POSTE (47) zeigt zwar, daß man Trypsin bis auf unwesentliche Reste aus dissoziierten Zellsuspensionen auswaschen kann. Es scheint aber unsicher, ob man mit dreimaligem Waschen der zu dissoziierenden Gewebsfragmente das eindiffundierte Trypsin quantitativ auswaschen kann. Daher wurde nach Inkubation mit Trypsin der Überstand verworfen und die Dissoziation der Fragmente in dem hinzugefügten Trypsininhibitor-Medium vorgenommen. Das während der Dissoziation aus den Gewebsspalten freigesetzte Trypsin wird dadurch inhibiert.

2. Trypsinkonzentration :

EASTY u. MUTOLO (14) zeigen, daß bei einem Minimum an mechanischer Belastung Trypsin * zwischen 0,002 % und 0,2 % gleich wirksam zur Dissoziation ist. MOSCONA (36) verwendet 1 % $\hat{=}$ 10 mg/ml Trypsin. Mit diesen Angaben stimmen die eigenen Ergebnisse überein: unter 1 mg/ml zeigt sich zwar ein Effekt in der Gewinnung von Einzelzellen, die im wesentlichen nur von der Oberfläche der Fragmente gelöst werden. Eine deutliche, konzentrationsabhängige Wirkung ist aber nur zwischen 1 und 10 mg/ml Trypsin erkennbar. Die Ausbeute an Einzelzellen nimmt mit steigender Trypsinkonzentration zu, während die anfallende Trümmermenge abnimmt. Durch Verschieben von mechanischer zu enzymatischer Einwirkung wird offensichtlich eine schonendere Dissoziation erzielt. Da mehr als 10 mg/ml Trypsin wegen der hohen Viskosität schlecht anzuwenden ist, erscheint diese Konzentration als optimal zur Gewinnung von Einzelzellen aus embryonaler Hühnerleber.

3. Zum Mechanismus der dissoziationsfördernden Wirkung des Trypsins :

Im Einklang mit der Literatur (4,39) wird gezeigt, daß die Dissoziationswirkung des Trypsins auf seiner Eigenschaft als

* ohne Angabe des Herstellers oder der Aktivität

Protease beruht. BARNARD et al. (4) beschreiben, daß sich Retinae schlechter dissoziieren lassen, wenn sie bei der Trypsininkubation aneinanderliegen und damit den Diffusionsweg für das Trypsin verlängern. Anscheinend ist die hohe Trypsinkonzentration von 10 mg/ml erforderlich, um ausreichende Diffusion des Trypsins in die Interzellulärräume der inkubierten Gewebsfragmente zu ermöglichen. Erst wenn die proteolytische Aktivität auch im Innern der Fragmente hoch genug ist, kann optimal dissoziiert werden.

4. Extinktionsmessung und Zellzählung :

Die Bestimmung der Zellkonzentration durch Extinktionsmessung ist besser reproduzierbar und weniger zeitraubend als das Zählen mit der Neubauer-Zählkammer. Voraussetzung zur Anwendung der photometrischen Bestimmung sind: a. ein Spektralbereich, in dem die zu zählenden Korpuskel keine Absorption, sondern nur Streuung des einfallenden Lichts zeigen, b. eine homogene Korpuskelgröße; d. h., im Falle dieser Arbeit sollte bei Bestimmung der Zellkonzentration die Menge der verunreinigenden Trümmer gering sein, c. nur ein Extinktionsbereich mit bekannter Relation zwischen Extinktion und Zellzahl pro ml sollte angewandt werden.

B. Stoffwechsel und Lebensfähigkeit nach Dissoziation

1. Proteinsynthese :

Die Kurzzeit-Inkubationen (Abb. 4) zeigen angenähert lineare Verläufe. Starke Schwankungen in der Proteinsynthese treten nicht auf. In Übereinstimmung mit der Langzeit-Inkubation (Abb. 6) wird auch kein Maximum gefunden. Nach ca. zehnstündigem konstanten Einbau sinkt die Einbaurate allmählich ab. Etwa 30 bis 45 Stunden nach Dissoziation ist kein Leucineinbau mehr festzustellen. Die einzelnen Versuche ergeben im Vergleich miteinander einige Widersprüche:

a. die 1:20 h nach Dissoziation aufgenommene Einbaukurve verläuft flacher als die 2:40-h-Einbaukurve. Das hieße, daß während der zweiten Messung ein Maximum des Leucineinbaus durchlaufen wird. Im Vergleich mit dem methodisch verlässlicheren Langzeiteinbau (Abb. 6) zeigt sich, daß nur eine geringfügige Schwankung des längerfristig konstanten Leucineinbaus vorliegt. Interessanterweise finden auch CASANELLO u. GERSCHENSON (10, Fig 6) an TPB-dissoziierten Rattenleberzellen, daß, wenn man im Anschluß an die Dissoziation 3 Stunden lang mit C-14-Leucin inkubiert, die Einbaukurve nach 30 Minuten abflacht. Nach weiteren 60 Minuten ist die vorübergehende Mindering der Einbaurrate wieder voll kompensiert. Wegen dieses ähnlichen Befundes möchte ich eine geringfügige Depression des Leucineinbaus nach Dissoziation nicht ausschließen.

b. Die 20:30 h nach Dissoziation aufgenommene Einbaukurve sinkt im Laufe von 60 Minuten unter den "Nullwert" ab. Eine Erklärung könnte sein, daß in den ersten Minuten nach Zugabe des C-14-Leucins in frischem (!) Medium eine kurzdauernde Erholung einiger Zellen bewirkt wird. Da das Zellkollektiv aber im Absterben begriffen ist, wird die in geringem Maße eingebaute Aminosäure wieder freigesetzt. Unter Material und Methoden (siehe S. 22) wurde schon darauf hingewiesen, daß der Nullwert eigentlich ein 2- bis 3-Minuten-Einbauwert ist.

c. In Abb. 5 sinkt die Einbaufähigkeit der Zellsuspension vom ersten Meßpunkt an ab. Dies steht im Widerspruch zu Abb. 4, die eine leichte Erhöhung des Einbaus ca. 2:40 h nach Dissoziation zeigt, und zu Abb. 6, die einen linearen Verlauf während dieser Zeit aufweist. Die größere Wahrscheinlichkeit der letzteren Darstellung ist in der Methodik begründet: Beim Langzeiteinbau verbleiben die Ansätze bis zum Abstoppen ständig im Wärmebad. Dagegen erlitten die 164 μ l-Ansätze der Kurzzeit-Einbauversuche zweimalige Temperaturwechsel durch Entnahme der Reagenzgläser aus dem Wärmebad zum Pipettieren. Vielleicht bewirkt der Temperaturwechsel das schnellere Zugrundegehen der Zellen.-

Nach Diskussion der Widersprüche und der methodischen Unterschiede wird als richtig angesehen, daß der Einbau des C-14-Leucins zunächst konstant ist und dann, acht Stunden nach Dissoziation, beginnt abzusinken. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen ANTLEY u. FOX (2). Sie untersuchen den Leucineinbau in Zellen, die durch mechanische Dissoziation aus Drosophila-Eiern gewonnen und zur Aggregation in bewegtem Medium kultiviert wurden. Der Leucineinbau ist bei ihren Versuchen konstant. Es zeigt sich weder dort noch in den eigenen Versuchen eine deutliche Depression des Leucineinbaus in Folge der Dissoziation mit anschließender Erholung der Zellen. In der bewegten Zellkultur von ANTLEY u. FOX sank der Leucineinbau nach längerer Inkubation jedoch nicht ab.

2. Ist der gemessene Leucineinbau eine zellgebundene, energieabhängige Syntheseleistung ?

- a. Der Zusatz von DNP zur Zellsuspension hemmt die oxydative Phosphorylierung und damit den Leucineinbau. Dieses Ergebnis schließt aus, daß die Zunahme an TCE-fällbarem Leucin lediglich durch Adsorption bewirkt wird, die zwar mit der Inkubationszeit zunimmt, aber von Energiezufuhr unabhängig ist. DNP wird ebenfalls von KEMP et al. (30) zur Hemmung der Proteinsynthese verwendet. Sie erzielen damit eine Aggregationshemmung. Die eigenen Versuche prüfen den Leucineinbau nur als Maß für die Stoffwechselleistung. Deshalb wurden Versuche wie Proteinsynthese-Hemmung durch Puromycin oder Actinomycin (2, 10, 19) im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.
- b. Zusatz von ATP zum DNP-gehemmten Ansatz steigert den Leucineinbau nicht. Damit ist ausgeschlossen, daß der gemessene Leucineinbau in der Zellsuspension durch Zellpartikel, Zellen mit defekter Oberfläche und damit durch ein extrazelluläres Proteinsynthese-System bewirkt wird. Aus dem Absinken des Einbaus im Vergleich zum DNP-gehemmten Ansatz wird geschlossen, daß Adenosin abgespalten wird.

c. Adenosin kann direkt zytotoxisch wirken (57). Wird es zum DNP-gehemmten Ansatz oder zu ungehemmten Ansätzen hinzugegeben, so bewirkt es eine Senkung des TCE-fällbaren Leucins unter den "Nullwert". Offensichtlich wird auch der Leucineinbau verhindert, der während des Einföhnens der Proben in die Rundfilter abläuft.

d. Nach Dissoziation können die Permeationsverhältnisse an der Zellmembran verändert sein. Dies ist am Beispiel der Rohrzuckerpenetration in trypsinierte Zellen untersucht worden (23). Es ist nicht ausgeschlossen, daß Veränderungen der Permeationsverhältnisse in die Einbaumessungen eingegangen sind.

e. Der geringere Einbau von Leucin in Zellen, die aus älterem embryonalen Gewebe gewonnen wurden, steht im Einklang mit der Beobachtung, daß sich embryonale Gewebe mit zunehmendem Alter nur durch größere mechanische Energie dissoziieren lassen. Dadurch werden sie möglicherweise beschädigt, so daß ihre Fähigkeit zur Reaggregation (40) und zum Leucineinbau beeinträchtigt sind.

Diese Kontrollversuche zeigen, daß der um den Nullwert korrigierte Leucineinbau einer energieabhängigen Proteinsynthese entspricht. Ihr Ausmaß wird möglicherweise durch Permeationsänderungen der Zellmembran beeinflusst. Für den Uridin- und Thymidineinbau werden analoge Verhältnisse angenommen.

3. RNA-Synthese :

Der gemessene Uridineinbau entspricht in seinem anfänglich gleichbleibenden Verlauf und im Absinken der Einbaurate ca. sechs Stunden nach Dissoziation (Abb. 7) den Ergebnissen der Literatur (2,20). Eine Depression der RNA-Synthese im Gefolge der Dissoziation wird nicht gefunden.

Der Verlauf des Uridineinbaus läßt zwei Deutungen zu :

a. Die RNA-Synthese läuft in den Zellen weiter, als sei das Gewebe nicht dissoziiert worden. Das Absinken der Synthese

wird durch eine Beeinträchtigung der Zellen hervorgerufen.

b. Die RNA-Synthese ist nach der Dissoziation gesteigert, damit die durch Trypsinierung und Dissoziation verlorengegangenen Proteine ersetzt werden können. Das Absinken stellt das Rückkehren zur normalen Syntheserate dar.-

Im Zusammenhang mit den übrigen Befunden halte ich die erste Möglichkeit für wahrscheinlicher (siehe unten).

4. DNA-Synthese :

Thymidin wird vom ersten Meßpunkt an mit konstanter Rate eingebaut. Es zeigt sich keine Beeinträchtigung in Folge der Trypsineinwirkung, wie BERRY et al. (6) sie an Chinese-hamster-Zellen sehen. Sechs bis sieben Stunden nach Dissoziation endet der Einbau abrupt.

Meine Ergebnisse bestätigen die von FRANK (19). Dort wird an embryonalen Rattenzellen ein zunächst konstanter Einbau von Thymidin gefunden. Im serumfreien Medium sinkt der H-3-Thymidineinbau nach etwa sechs Stunden auf unerhebliche Werte (19). Das Aufhören des Thymidineinbaus in den eigenen Versuchen etwa sechs bis sieben Stunden nach Dissoziation zeigt eine Beeinträchtigung der Zellen an. Hinweise auf eine Synchronisation der Zellen durch Trypsinbehandlung (6), die den Verlauf des Einbaus erklären könnte, finden sich nicht. Nach Sistieren des Thymidineinbaus baut die im Medium enthaltene DNase I das TCE-fällbare Thymidin ab.

5. Beurteilung der Lebensfähigkeit :

Im Vergleich des Langzeiteinbaus von Leucin, Uridin und Thymidin (Abb. 6 bis 8) fällt auf, daß der Einbau der drei untersuchten Substanzen zunächst konstant ist. Auf die eintretende Zellschädigung zeigt der Leucineinbau die geringste, der Thymidineinbau die empfindlichste Reaktion.

a. Der Einfluß der hier angewandten Zellkultur-Bedingungen ist schwer abzuschätzen. Deshalb kann nicht entschieden wer-

den, ob im einsetzenden Zelluntergang eine verzögerte Reaktion auf die Trypsindissoziation, eine Verschlechterung der Kulturbedingungen oder z.B. das Fehlen eines Serumzusatzes zum Medium (19) zu sehen ist. Diese Frage könnte durch einen Versuch beantwortet werden, in dem ein längeres Überleben der Zellen möglich ist, z.B. mit einem "gyratory shaker" (36), der das Problem der An- und Abdiffusion der Nährstoffe und der Metaboliten der Zellen löst. Eine ähnliche Versuchsanordnung ist auch für kleine Volumen beschrieben (25).

b. Das Abschätzen der Lebensfähigkeit wird bisher durch Farbstoffexklusion (27,29,36) vorgenommen. DICKSON schlägt die Aufnahme von nichtmetabolisierbaren, radioaktiven Aminosäuren durch die Zellen vor (13). Die Anwendung des Thymidineinbaus bietet sich aus folgenden Gründen an : i. die eigenen Versuche zeigen, daß auf Zellschädigung eine empfindliche Reaktion erfolgt. ii. BERRY u. FRIEND (5) zeigen, daß durch Herausreißen von tight junctions aus der Zelloberfläche Störungen der Morphologie und Funktion der Zellmembran mit Vakuolenbildung in den Zellen vorliegen. Trotz der allgemein akzeptierten Anwendung der Farbstoffexklusion ist es zumindestens theoretisch anzweifelbar, ob an eben dissoziierten Zellen die Membranfunktion Kriterium der Lebensfähigkeit sein soll. iii. Der Thymidineinbau ist mit der Vermehrung der Zellen verknüpft; die Vermehrung ist entscheidendes Kriterium der Lebensfähigkeit auf zellulärer Ebene. Eine direkte Beeinflussung des Einbaus durch die Membranfunktion ist nicht erkennbar. iv. Bei synchronisierten Zellen in der G-Phase des Zell-Zyklus' wäre die Aussagekraft jedoch gering.

6. Zusammenfassung Stoffwechsel und Lebensfähigkeit :

Die durch Dissoziation gewonnenen Zellen zeigen in den ersten sieben Stunden nach Dissoziation entsprechend den durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich Stoffwechsel und Lebensfähigkeit keine Beeinträchtigung als Folge der Behandlung.

Der dann einsetzende Zelluntergang ist entweder verzögerte Folge der Dissoziation oder Einfluß der sich verschlechternden Kulturbedingungen. Der Thymidineinbau ist das empfindlichste Kriterium des Zelluntergangs.

C. Stabilität der untersuchten Markierungen

1. Deutung der Befunde :

Unter den gewählten Bedingungen verlieren die Zellen die nach Dissoziation eingebauten Markierungen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Die Befunde können wie folgt gedeutet werden:

- a. Protein-Markierung : Das mit C-14-Leucin markierte Protein wurde nur sehr langsam abgebaut (Abb. 11). Es ist nicht sicher, ob es sich hierbei nur um intrazelluläres Protein handelt. Denn nach Zellyse wird das extrazellulär gelegene Protein mangels proteolytischer Aktivität des Mediums nur langsam abgebaut. Über eine Korrelation zur Zellzahl kann daher keine Aussage gemacht werden.
- b. DNA-Markierung : Der Verlust an markierter DNA (Abb. 10) und das Absinken der Leucin-Einbaurrate (Abb. 9) zeigen zwischen sieben und dreißig Stunden nach Dissoziation einen stark abfallenden Verlauf. Die Kurven sind nahezu parallel. Der Zusammenhang ist vielleicht folgendermaßen zu sehen: Als mögliche Folge der Trypsinierung bestehen Zellwanddefekte. Diese ermöglichen, daß die im Medium enthaltene DNase in die Zellen eindringt und die markierte DNA abbaut. Über eine verringerte RNA-Synthese nimmt mittelbar auch der Leucineinbau ab. Hierbei sind auch das sich verschlechternde Medium sowie die abnehmende ATP-Synthese zu berücksichtigen. Als Fehlermöglichkeit ist bei der DNA-Markierung zu berücksichtigen, daß das TCE-fällbare Thymidin einer Zellsuspension abnehmen kann, ohne daß sich die Zahl der äußerlich kaum veränderten Zellen verringert. Denn DNA-Degradierung bewirkt offensichtlich keine sofortige Zellyse.

2. Anwendbarkeit der Markierungen :

a. Thymidin: Durch Markierung mit radioaktivem Thymidin gewinnt man ein Maß für die lebenden Zellen, die auch Stoffwechselaktivität zeigen. Bei kurzen Untersuchungszeiträumen dürfte der Fehler durch Zellvermehrung gering sein.-

b. Leucin: Die Markierung mit radioaktivem Leucin ist hier nicht sicher zu beurteilen.

Markierungsversuche mit radioaktivem Uridin wurden nicht unternommen. ANTLEY u. FOX (2) zeigen an embryonalen Drosophila-Zellen einen hohen RNA-Umsatz pro Zeiteinheit, der durch die Funktion der RNA bedingt ist.

D. Verwendbarkeit der Zellen in Aggregationsversuchen

Innerhalb ca. sieben Stunden nach Dissoziation ist die mit der Standardmethode hergestellte Zellsuspension voll für Aggregationsversuche verwendbar. Da die Zellen über diesen Zeitraum hinaus äußerlich intakt erscheinen, können auch dann noch Eigenschaften der Zelloberfläche geprüft werden. Unter anderen Bedingungen wie Serumzusatz zum Medium (19) und Bewegen der Zellsuspension (25,36) läßt sich der Zeitraum der vollen Verwendbarkeit möglicherweise erweitern.

E. Elektronenmikroskopische Literatur

Auf elektronenmikroskopische Hinweise aus der Literatur bezüglich der zellverbindenden Strukturen und deren Schicksal nach Dissoziation wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen. Ihre Kenntnis hat sich jedoch als nützlich erwiesen: (11,12,15,16,17,18,31,35,44,45,46,48,52,53,54,56).

V. Zusammenfassung

A. Um Zellen für Aggregationsversuche zu gewinnen, wurden Lebern von 8 bis 10 Tage alten Hühnerembryonen dissoziiert. Dabei ergab sich eine optimale Trypsinkonzentration von 10 mg/ml entsprechend 2.100 U/ml für die Inkubation vor Dissoziation, wie sie auch von MOSCONA (36) angewandt wird. In Abwandlung seiner Dissoziationsmethode wird an Stelle der CMF-Vorinkubation das Gewebe in Medium zerschnitten, das 5 mmol/l Citrat enthält. Unter Berücksichtigung neuerer Literatur (47,58) wird ein Zusatz von Trypsininhibitor vor der Dissoziation empfohlen. In einem Vergleich zwischen Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer und Extinktionsmessung bei 620 nm wurde gute Übereinstimmung festgestellt.

B. Durch Einbau von C-14-Leucin, H-3-Uridin und H-3-Thymidin in TCE-fällbare Polymere wurde das Verhalten der Zellen nach Dissoziation untersucht. Etwa 8 Stunden lang wurden die untersuchten Substanzen mit konstanter Rate eingebaut. Der H-3-Thymidineinbau erwies sich als empfindlichster Parameter für den dann einsetzenden Zelluntergang durch die Kulturbedingungen.

C. Das Verbleiben von TCE-fällbarem H-3-Thymidin und C-14-Leucin wurde hinsichtlich der Markierung verschiedener Zelltypen in Aggregationsversuchen überprüft. H-3-Thymidin sank in der Zellkultur in gleichem Maße wie die Leucin-Einbaurate rasch, die Markierung mit C-14-Leucin unabhängig davon langsam.

D. Innerhalb 7 bis 8 Stunden nach Dissoziation sind die gewonnenen Zellen für Aggregationsversuche voll verwendbar. Eine Beurteilung der Dissoziationsfolgen bzw. der Verwendbarkeit über einen längeren Zeitraum ist nur unter beschriebenen Versuchsbedingungen (25,36) möglich.

Literaturverzeichnis

- ANDERSON, N.G.: The Mass Isolation Of Whole Cells From Rat Liver. Science 117, 627-628 (1953)
- ANTLEY, R.M., A.S. FOX: The Relationship Between RNA and Protein Synthesis And The Aggregation Of Drosophila Embryonic Cells. Develop Biol 22, 282-297 (1970)
- AUERBACH, R., C. GROBSTEIN: Inductive Interaction Of Embryonic Tissue After Dissociation And Reaggregation. Exptl Cell Res 15, 384-397 (1958)
- BARNARD, P.J., L. WEISS, T. RATCLIFFE: Changes In The Surface Properties Of Embryonic Chick Neural Cells After Dissociation. Exptl Cell Res 54, 293-301 (1969)
- BERRY, M.N., D.S. FRIEND: High-Yield Preparation Of Isolated Rat Liver Parenchymal Cells. J Cell Biol 43, 506-520 (1969)
- BERRY, R.J., H.J. EVANS, D.M. ROBINSON: Perturbations In X-Ray Dose Response In Vitro With Time After Plating: A Pitfall In Comparison Of Results Obtained By Different Laboratories Using Asynchronous Cell Systems. Exptl Cell Res 42, 512-522 (1966)
- BOLLUM, F.J.: Thermal Conversions Of Nonpriming Deoxyribonucleic Acid To Primer. J Biol Chem 234, 2733-2734 (1959)
- BOLLUM, F.F.: Filter Paper Disk Technique For Assaying Radioactive Macromolecules. in "Procedures in Nucleic Acid Research" (G.L. Cantoni + R. Davies ed.) S. 296-300. Harper + Row, Publishers, New York 1966
- BRANSTER, M.V., R.K. MORTON: Isolation Of Intact Liver Cells. Nature 180, 1283-1284 (1957)
- CASANELLO, D.D., L.E. GERSCHENSON: Some Morphological And Biochemical Characteristics Of Isolated Rat Liver Cells Dissociated With Sodium Tetraphenylboron And Cultured In Suspension. Exptl Cell Res 59, 283-290 (1970)
- CURTIS, A.S.G.: Cell Adhesion. (I) Basic Structure And Biophysics. (II) The Biological Evidence. in "The Cell Surface: Its Molecular Role In Morphogenesis." (A.S.G. Curtis ed.) S. 80-177 Logos Press, Academic Press, London 1967

12. DAVID, H.: Zur Morphologie der Lebermembran. Z Zellforsch 55, 220-234(1961)
13. DICKSON, J.A.: The Uptake Of Non-Metabolizable Amino Acids As An Index Of Cell Viability In Vitro. Exptl Cell Res 61, 235-245(1970)
14. EASTY, G.C., V.MUTOLO: The Nature Of The Intercellular Material Of Adult Mammalian Tissues. Exptl Cell Res 21, 374-385(1960)
15. FARQUHAR, M.G., G.E.PALADE: Junctional Complexes In Various Epithelia. J Cell Biol 17, 375-412(1963)
16. FARQUHAR, M.G., G.E.PALADE: Cell Junctions In Amphibian Skin. J Cell Biol 26, 263-291(1965)
17. FAWCETT, D.W.: Structural Specializations Of The Cell Surface. in "Frontiers In Cytology" (S.F.Palay ed.) S.19-41. Yale University Press, New Haven 1958
18. FAWCETT, D.W.: In Histology And Cytology. in "Modern Developments in Electron Microscopy" (B.M.Siegel ed.) S.257-333. Academic Press, New York 1964
19. FRANK, W., S.ZABEL: Über die Bedeutung von Kälberserum für Kulturen embryonaler Rattenzellen. Exptl Cell Res 59, 186-192(1970)
20. FRISTROM, J.W., B.B.KNOWLES: Studies On Protein Synthesis In Imaginal Discs Of Drosophila Melanogaster. Exptl Cell Res 47, 97-107(1967)
21. GLAESER, R.M., J.E.RICHMOND, P.W.TODD: Histotypic Self-Organisation By Trypsin-Dissociated And EDTA-Dissociated Chick Embryo Cells. Exptl Cell Res 52, 71-85(1968)
22. GRUNZ, H.: Hemmung der Reaggregation dissoziierter Amphibienzellen durch Inhibitoren der RNS- und Protein-Synthese. Wilhelm Roux Arch Mech Org 163, 184-196(1969)
23. GÜNTHER, T., C.GOECKE: Änderung der Permeabilität bei der Isolierung von Zellen. Z Naturforsch (B) 21b, 1171-1174(1966)
24. HAM, R.G.: Clonal Growth Of Mammalian Cells In A Chemically Defined Synthetic Medium. Proc Natl Acad Sci 53, 288-293(1965)
25. HENKART, P., T.HUMPHREYS: Cell Aggregation In Small Volumes On A Gyrotory Shaker. Exptl Cell Res 63, 224-227(1970)

26. HERBST, C.: Über das Auseinandergehen von Furchungs- und Gewebezellen in kalkfreiem Medium. Arch f Entwicklmech 9, 424-463(1900)
27. HOLMBERG, B.: On The Permeability To Lissamine Green And Other Dyes In The Course Of Cell Injury And Cell Death. Exptl Cell Res 22, 406-414(1961)
28. HUMPHREYS, T.: Chemical Dissolution And In Vitro Reconstruction Of Sponge Cell Adhesions. 1. Isolation And Functional Demonstration Of The Components Involved. Develop Biol 8, 27-47(1963)
29. KALTENBACH, J.P., M.H. KALTENBACH: Nigrosin As A Dye For Differentiating Live And Dead Ascites Cells. Exptl Cell Res 15, 112-117(1958)
30. KEMP, R.B., B.M. JONES, I. CUNNINGHAM, M.C.M. JAMES: Quantitative Investigations On The Effect Of Puromycin On The Aggregation Of Trypsin- And Versene-Dissociated Chick Fibroblast Cells. J Cell Sci 2, 323-340(1967)
31. KHAN, T., J. OVERTON: Staining Of Intercellular Material In Reaggregation Chick Liver And Cartilage Cells. J Exp Zool 171, 161-174(1969)
32. LAWS, J.O., L.H. STICKLAND: The Adhesion Of Liver Cells. Exptl Cell Res 24, 240-254(1961)
33. MACDONALD, K.B., W.R. BRUCE: A Minicolony Assay For The Viability Of Mammalian Cells In Vitro. Exptl Cell Res 50, 471-473(1968)
34. MANS, R.J., G.D. NOVELLI: Measurement Of The Incorporation Of Radioactive Amino Acids Into Protein By A Filter Paper Disk Method. Arch Biochem Biophys 94, 48-53(1961)
35. MILLONIC, G., G. GIUDICE: Electron Microscopic Study Of The Reaggregation Of Cells Dissociated From Sea Urchin Embryos. Develop Biol 15, 91-101(1967)
36. MOSCONA, A.: Rotation-Mediated Histogenetic Aggregation Of Dissociated Cells. Exptl Cell Res 22, 455-475(1961)
37. MOSCONA, A.A.: Inhibition By Trypsin Inhibitors Of Dissociation Of Embryonic Tissue By Trypsin. Nature 199, 379-380(1963)
38. MOSCONA, A.A.: Studies On Cell Aggregation: Demonstration Of Materials With Selective Cell-Binding Activity. Proc Natl Acad Sci 49, 742-747(1963)

39. MOSCONA, A.A.: Recombination Of Dissociated Cells And The Development Of Cell Aggregates. in "Cells and Tissues in Culture" (E.N. Willmer ed.) Vol 1, 489-529. Academic Press, London 1965
40. MOSCONA, A., T. WEIS. (1961), nicht publiziert, zit. nach (39)
41. MOSCONA, A., O.A. TROWELL, E.N. WILLMER: Methods. in "Cells and Tissues in Culture" (E.N. Willmer ed.) Vol. 1, 19-98, Academic Press, London 1965
42. MOSCONA, A.A., M.H. MOSCONA: Comparison Of Aggregation Of Embryonic Cells Dissociated With Trypsin Or Versene. *Exptl Cell Res* 45, 239-243 (1967)
43. ORR, C.W., S. ROSEMAN: Intercellular Adhesion. 1. A Quantitative Assay For Measuring The Rate Of Adhesion. *J Membrane Biol* 1, 109-124 (1969)
44. OVERTON, J.: Desmosome Development In Normal And Reassociating Cells in Early Chick Blastoderm. *Develop Biol* 4, 532-548 (1962)
45. OVERTON, J.: The Fate Of Desmosomes In Trypsinized Tissue. *J Exp Zool* 168, 203-214 (1968)
46. OVERTON, J.: A Fibrillar Intercellular Material Between Reaggregating Embryonic Chick Cells. *J Cell Biol* 40, 136-143 (1969)
47. POSTE, G.: Tissue Dissociation With Proteolytic Enzymes. Adsorption And Tissue Activity Of Enzymes At The Cell Surface. *Exptl Cell Res* 65, 359-367 (1971)
48. REVEL, J.P.: Fine Structure Of Intercellular Contacts In The Sponge, *Microciona prolifera*. *Biol Bull* 130, 402 (1966)
49. RINALDI, L.M.: An Improved Method For The Isolation And Quantitative Cultivation Of Embryonic Cells. *Exptl Cell Res* 16, 477-505 (1959)
50. RODBELL, M.: Metabolism Of Isolated Fat Cells. II. The Similar Effects Of Phospholipase C (*Clostridium perfringens* Toxin) And Of Insulin On Glucose And Amino Acid Metabolism. *J Biol Chem* 241, 130-139 (1966)
51. ROTH, S.A., J.A. WESTON: The Measurement Of Intercellular Adhesion. *Proc Natl Acad Sci* 58, 974-980 (1968)

52. SHEFFIELD, J.B.: Studies On Aggregation Of Embryonic Cells: Initial Cell Adhesion And The Formation Of Intercellular Junctions. J Morph 132, 245-264(1970)
53. SHEFFIELD, J.B., M. ISAACSON, D. JOHNSON: Visualization Of Surface Structures On Embryonic Cells With A Simple Electron Gun Scanning Microscope. Exptl Cell Res 64, 49-56(1971)
54. SJÖSTRAND, F.S.: The Ultrastructure Of The Plasma Membrane Of Columnar Epithelium Cells Of The Mouse Intestine. J Ultrastruct Res 8, 517-541(1963)
55. SÜSS, R., M. VOLM: Rapid Screening Of Macromolecular Synthesis In Single Cell Cultures. Z Naturwiss 55, 134(1968)
56. TRELSTAD, R.L., E.D. HAY, J.P. REVEL: Cell Contact During Early Morphogenesis In The Chick Embryo. Develop Biol 16, 78-106(1967)
57. TROWELL, O.A.: Lymphocytes. in "Cells and Tissues in Culture" (E.N. Willmer ed.) Vol. 2, 96-172, Academic Press, London 1965
58. WIEPJES, G.J., F.J.A. PROP: Improved Method For Preparation Of Single Cell Suspensions From Mammary Glands Of Adult Virgin Mouse. Exptl Cell Res 61, 451-454(1970)

=====

VII. Anhang

Zusammensetzung der einfachen Salzlösung R 5

Im Prinzip handelt es sich um eine ergänzte physiologische Kochsalzlösung. Auf pH 7,4 wurde eingestellt mit

- a. einem 6×10^{-3} molaren Phosphatpuffer und
- b. Natriumbikarbonat und Durchleiten von 5 % CO_2 /Luft bei 760 mm Hg.

Die im Extrazellulärraum übliche Konzentration an K^+ wurde durch Zugabe von KCl erreicht. Die Glucose hat die 1,5-fache Konzentration des Blutzuckerspiegels von Hühnern. Die Osmolarität wurde mit NaCl auf 325 mosmol eingestellt.

<u>Substanzen</u>	<u>Gramm</u>
1. NaHCO_3	1,30
2. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,808
3. KH_2PO_4	0,112
4. KCl	0,261
5. Glucose	3,0
6. Phenolrot	0,01
7. NaCl	7,35
8. aqua dest ad 1 Liter,	
9. 5 % CO_2 /Luft bei 760 mm Hg durchleiten.	

Lebenslauf

Am 1. Januar 1945 wurde ich, Helmut Rogge, als Sohn des Bankkaufmanns Wilhelm Rogge und seiner Ehefrau Ida, geb. Wendt, in Berlin geboren.

Von 1950 an besuchte ich die Grundschule in Berlin, von 1956 an die Droste-Hülshoff-Schule, neusprachliches und naturwissenschaftliches Gymnasium in Berlin-Zehlendorf, wo ich im März 1963 das Abitur ablegte.

Nach dem Tode meines Vaters 1963 trat ich eine kaufmännische Lehre bei der Siemens-Schuckertwerke AG an, die ich 1965 vor der Industrie- und Handelskammer in Erlangen abschloß.

Anschließend studierte ich an der Freien Universität Berlin Medizin. Nach dem Vorphysikum im Frühjahr 1966 und nach dem Physikum im Herbst 1967 bestand ich hier das medizinische Staatsexamen im März 1971.

Die Medizinalassistentenzeiten leistete ich am Physiologisch-Chemischen Institut der Freien Universität Berlin und auf der Inneren und Chirurgischen Abteilung des Behring-Krankenhauses in Berlin-Zehlendorf ab. Seit meiner Approbation im April 1972 arbeite ich bei Herrn Prof. Dr. Risse im Sonderforschungsbereich Embryonalpharmakologie als Assistent.

Seit September 1971 bin ich mit der Medizinalassistentin Gisela Rogge, geb. Brand, verheiratet.

Druck:

Der Präsident der Freien Universität Berlin
- Universitätsdruckerei -

1 Berlin 41, Kelchstraße 31

